

椋山女学園大学

各種麹菌を用いた大豆麹中のo-ジヒドロキシイソフラボンの生成・変動と麹の抗酸化性

著者	江崎 秀男, 和久 豊
雑誌名	椋山女学園大学研究論集 自然科学篇
号	35
ページ	117-125
発行年	2004
URL	http://id.nii.ac.jp/1454/00003115/

各種麹菌を用いた大豆麹中の *o*-ジヒドロキシイソフラボンの生成・変動と麹の抗酸化性

江崎 秀男*・和久 豊**

Formations and Changes of *o*-Dihydroxyisoflavones in the Soybean Koji
Fermented with Various *Aspergillus* spp. and the Antioxidant Activities of Koji

Hideo ESAKI and Yutaka WAGU

1. はじめに

我国をはじめとする東アジアの国々では、味噌、醤油、納豆等の様々な大豆発酵食品が造られてきた。これらの発酵食品は、その発酵・熟成過程において、種々の微生物の働きにより、原料大豆の消化性を向上し、特有の風味を付与し、また新たな生理・生体調節機能を発現する場合も多い¹⁾。発酵食品中に生成する抗酸化成分は、食品の酸化的品質劣化を防ぐのみならず、生体内においては種々のラジカル類を捕捉し、発ガン、虚血性疾患、動脈硬化、糖尿病等の生活習慣病の発症や老化の進行を抑制・遅延する可能性も大きい²⁾。著者らはこれまでに、麹菌を用いた豆味噌³⁾⁻⁴⁾、醤油⁵⁾、濱納豆⁶⁾等の大豆発酵食品より強い抗酸化性を示す *o*-ジヒドロキシイソフラボン (ODI) を見出すとともに、このイソフラボンが大豆の製麹工程において、*Aspergillus* 属の産生する水酸化酵素の働きで生成することを明らかにした⁷⁾。

最近、生活習慣病の予防や健康維持を目的として、食品或いは食品素材の抗酸化能を高める試みが多くなされている⁸⁾。大豆は良質の栄養成分を豊かに含有するのみならず、また多種多様の機能性成分も含む。大豆中のイソフラボン類も多彩な機能を有し、予防医学の面からも注目されている⁹⁾。本報においては、まず、各種醸造物に利用される麹菌を用いて大豆麹を調製し、その抗酸化性を調べるとともに、種々の生理機能が期待されるこの ODI¹⁰⁾が、麹菌の種類、或いはその製麹条件によってどのように生成し、また変動するかを検討したので報告する。

* 生活科学部 食品栄養学科

** 株式会社ビオック

2. 実験方法

2.1 供試菌株および試薬

大豆麴の調製には、豆味噌、米味噌、麦味噌、濃口醤油、甘酒、清酒、泡盛等に利用される8種類の麴菌（種麴）を使用した。その菌株の種類は、*A. oryzae* KBN 606, KBN 919, KBN 930, KBN 943, KBN 950, KBN 969, KBN 1010（若番順）および *A. saitoi* IAM 2210 である。各種試薬類は入手可能な限り、特級グレードを使用した。

2.2 各種麴菌を用いた製麴日数の異なる大豆麴の調製

大豆麴の調製は、種麴メーカーである(株)ビオック(豊橋市)にて雑菌の混入を防ぎながら、注意深く行った。大豆（カナダ産白目）は3倍量の水に30℃で3時間浸漬した後、水切りを行った。この大豆を5℃で一晩の限定吸水を行った後、オートクレーブで加熱処理した（115℃, 60分間）。蒸煮大豆に各種麴菌（8種類）を接種し（孢子数 1×10^6 /原料大豆 1g）, 30℃の恒温機で常法どおり培養を行った。この間、製麴日数1日目, 2日目, 3日目, 6日目に各種大豆バラ麴の一部を取り出し、これらを即座に冷凍した。また、麴菌接種前の蒸煮大豆を、発酵日数0日目の麴として同様に冷凍した。その後、凍結乾燥法により、乾燥粉末（lyophilized powder: LP）を調製した。

2.3 各種大豆麴の抗酸化力の測定

製麴日数の異なる各種大豆麴のLP 30mg ずつを精秤し、ここに0.05%トリフルオロ酢酸（TFA）を含む70%メタノール7.5mLを加え、振盪抽出（20℃, 16時間）を行った。遠心分離（3500rpm, 10分間）後、得られた上澄み液の200μLを試料溶液として、その抗酸化力をリポソームを用いた抗酸化試験法¹¹⁾で測定した。すなわち、卵黄レシチン（和光純薬）の超音波処理によって得られた単分子膜のリポソーム（small unilamellar vesicles: SUV）溶液（1mg/mL）の100μLに、10mMりん酸緩衝液（pH 7.4）600μLおよび試料溶液200μLを混合した。ここに40mM 2,2'-アゾビス（2-アミジノプロパン）2 塩酸塩（AAPH）溶液100μLを加え、37℃で3時間放置した。反応終了後、1%ブチルヒドロキソトルエン（BHT）／メタノール100μLを加え、SUVより生成したチオバルビツール酸陽性物質（TBARS）量を535nmの吸光度で測定した。この時、試料溶液の代わりに抽出溶媒のみを加えた対照実験（コントロール）も同時に行い、これより得られた吸光度を100%として各試料の酸化率（%）を求めた。従って、この値が小さいもの程、強い抗酸化性を示すことになる。なお、これらの実験は各試料1検体につき4連で行い、その平均値および標準偏差（SD）でこの活性を評価した。

2.4 各種大豆麴中のイソフラボン類の定量

製麴日数の異なる各種大豆麴のLP 1.5g ずつを精秤し、ここに0.1% BHT, 0.1% TFA および内部標準物質として50ppmのクロラムフェニコール（CP）を含む70%メタノール溶液6.0mLを加え、振盪抽出（20℃, 16時間）を行った。遠心分離後、得られた上澄液の5μLを試料溶液として、フォトダイオードアレイ検出器（SPD-M10A, Shimadzu）を装備した三次元HPLCにてイソフラボン類の同定および定量を既報³⁾と同様の条件で行った。

2.5 製麹日数の異なる味噌玉麹各部位中の ODI の定量

A. oryzae KBN 943 株を使用した製麹日数の異なる味噌玉麹（0 日麹, 2 日麹, 4 日麹）を、醸造メーカーより入手した。これらの円柱状の麹より、表層部（表面より 2mm の厚さ）、中層部（4mm の厚さ）、深層部（直径 8mm の円柱）を集め、それぞれを凍結乾燥し、味噌玉麹各部位の LP を調製した。その後、2.4 と同様の方法で、各 LP 中のイソフラボン類の定量を行った。

3. 実験結果および考察

3.1 各種大豆麹の生育状況

8 種類の麹菌（*A. oryzae* KBN 606, KBN 919, KBN 930, KBN 943, KBN 950, KBN 969, KBN 1010, *A. saitoi* IAM 2210）を接種した蒸煮大豆は、製麹 1 日目には菌糸の伸長が旺盛に進み、大豆バラ麹の表面は白い菌糸体で覆われていた。2 日目の麹においては孢子形成が始まり、その後製麹日数の経過とともに孢子着生が進行した。6 日間の製麹によって孢子着生はほぼ完了した。これら大豆麹の色は菌株によって異なり、白色、黄緑色、褐色、黒色等を呈していた。

3.2 各種麹菌を用いた大豆麹の抗酸化性

8 種類の麹菌で培養した製麹日数の異なる大豆麹の 70%メタノール抽出液を用いて、生体膜モデルとしてのリボソームを基質とした抗酸化性を調べ、その結果を図 1 に示した。この図においては、原料蒸煮大豆（0 日目）の示す酸化率を 100%として、各製麹日数の麹の酸化率を示したので、棒グラフが短いほど強い抗酸化力が認められたことになる。KBN 606 株（*A. oryzae*）で培養した大豆麹（図中の左最上段）においては、製麹日数 1 日目、2 日目、3 日目、6 日目で、酸化率はそれぞれ 85%、81%、72%、66%となり、製麹日数の経過とともに麹の抗酸化力は増強した。この大豆麹の抗酸化力の増強は、いずれの麹菌を使用した場合にも同様に認められたが、その程度には差があった。KBN 919 株や KBN 969 株の抗酸化力の増強は、微弱であった。他方、KBN 930 株、KBN 943 株、KBN 950 株、KBN 1010 株においては、KBN 606 株に匹敵する抗酸化力の増強が認められた。最も強い抗酸化力の増強が観察されたのは、*A. saitoi* を使用した大豆麹であり、製麹日数 6 日目において酸化率 26%という強い酸化抑制を示した。

3.3 各種大豆麹における *o*-ジヒドロキシイソフラボンの生成と変動

著者らは、これまでに豆味噌用の味噌玉麹⁶⁾や醤油麹⁵⁾中に強い抗酸化性を示す ODI, すなわち 8-ヒドロキシダイゼイン (8-OHD), 8-ヒドロキシゲニステイン (8-OHG), 6-ヒドロキシダイゼイン (6-OHD) が含まれることを報告した。また、これらのイソフラボン類が、味噌や醤油の醸造過程、或いは流通・貯蔵時にも抗酸化的役割を十分に担っていることを明らかにした。

ところで、豆味噌醸造メーカーで使用される味噌玉麹は、蒸煮大豆をすり潰したものを円柱状の玉とし、これに 1 種類或いはそれ以上の麹菌（*A. oryzae*）を接種して調製される。これらの操作は通常開放下で行われるため、種々の細菌類や酵母等の混入も容易である。

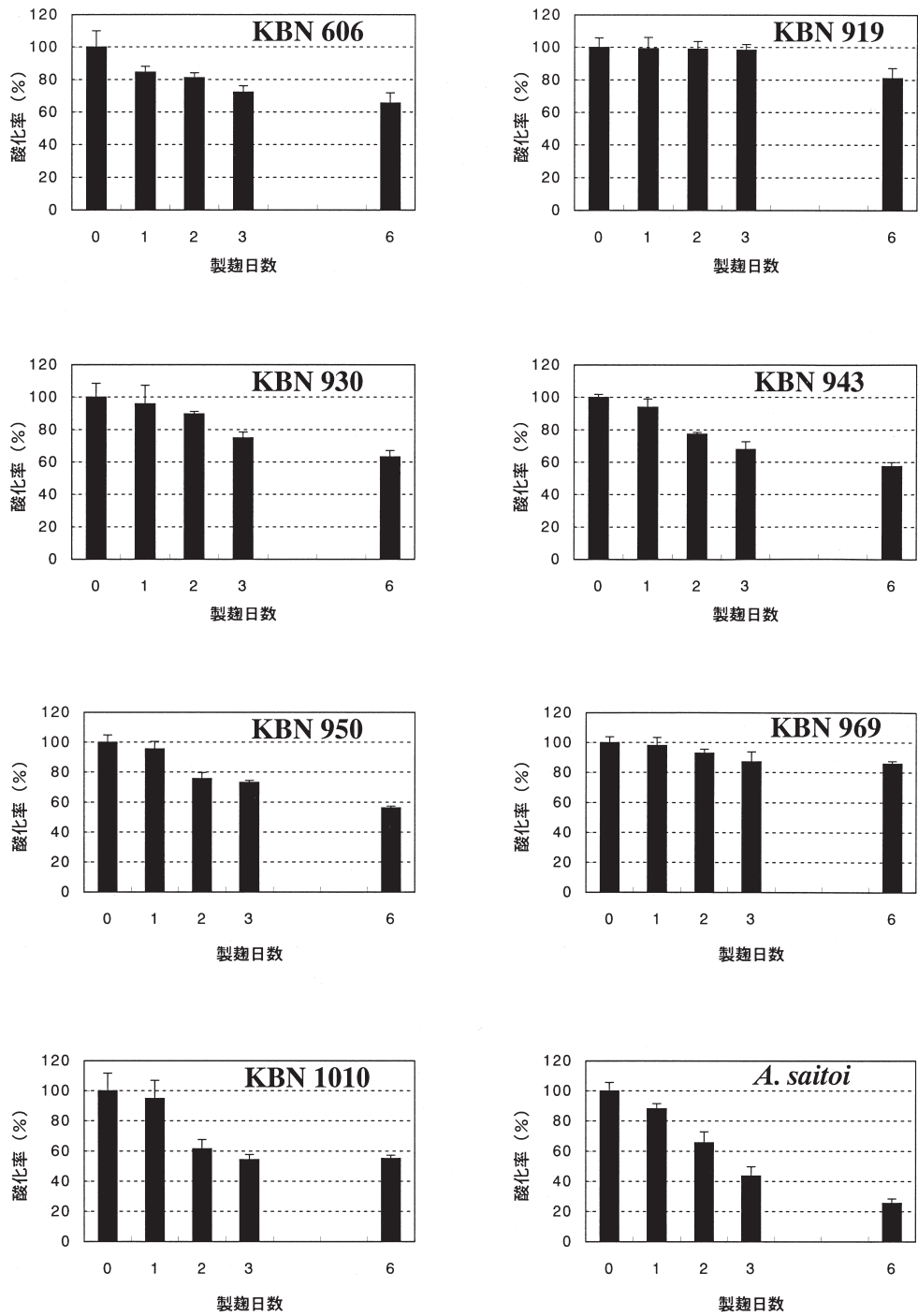


図1 各種麹菌を用いた大豆麹の抗酸化性の変動

味噌玉麹の製麹時には、麹菌の生育も盛んであるが、その内部では乳酸菌等の増殖も同時に進行しており、これらも豆味噌の風味に影響を及ぼしている。溜り醤油麹においても、同様のことが考えられる。

ところで、テンペ (*Rhizopus* spp. で発酵させたインドネシアの伝統的大豆発酵食品) 中には、古くから 6-OHD の存在が知られている。しかし、最近 Klusら¹²⁾⁻¹³⁾ は、この 6-OHD がテンペ発酵中に混入した細菌類 (*Micrococcus* sp., *Arthrobacter* sp.) によって生成されることを明らかにした。

本実験では、蒸煮した大豆に雑菌の混入を防いで、各種麹菌を接種し、大豆バラ麹の純粋培養を行った。そして、これら麹中のイソフラボン類を分析することにより、味噌玉麹や醤油麹に見出した ODI が、麹菌によって特異的に生産されるか否かを調べることにした。また、麹菌の菌株の差異が、8-OHD、6-OHD、8-OHG の生成と変動にどのような影響を及ぼすかを検討した。

8 種類の麹菌を用いた大豆麹の多くより、三次元 HPLC 法で 8-OHD、6-OHD、8-OHG を同定した (図 2)。すなわち、麹菌が直接的にこれら ODI を生成することを確認した。次に、製麹日数の経過にともなうイソフラボン類の変動を調べ、その代表的なパターン (*A. oryzae* KBN 606, KBN 943, KBN 919, *A. saitoi* の 4 例) を図 3 に示した。いずれの麹菌においても、原料大豆中のイソフラボン配糖体であるダイジンおよびゲニステインは、これら麹菌の産生する β -グルコシダーゼの作用 (データ未掲載) によって加水分解され、配糖体量は製麹日数の経過とともに減少した。逆に、これら配糖体のアグリコンであるダイゼインおよびゲニステインの量は増加したが、製麹日数 2 日目以降の変動は菌株によって異なっていた。

ODI の生成と変動についても、麹菌の種類によって差異が認められた。KBN 606 株では、

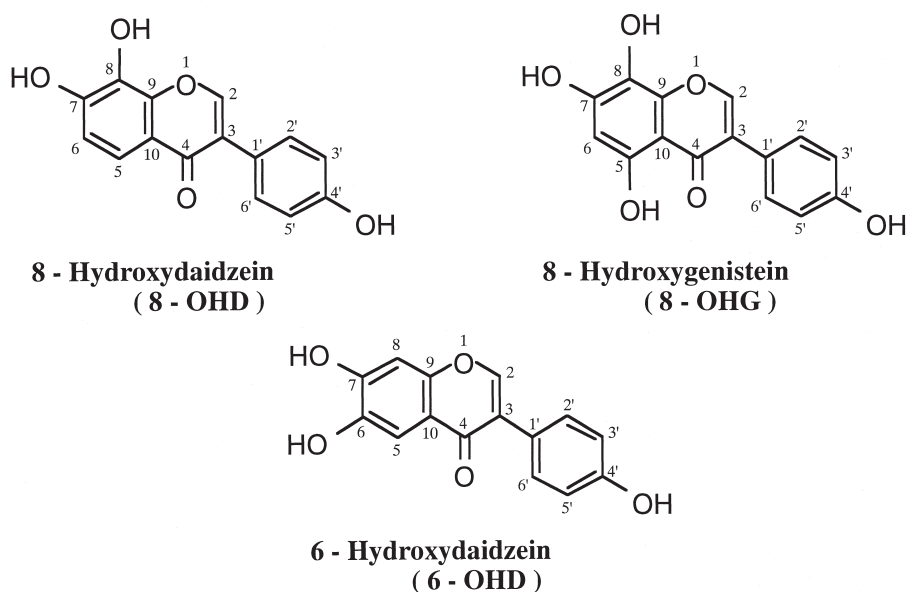


図2 各種大豆麹中に同定された *o*-ジヒドロキシイソフラボン (ODI)

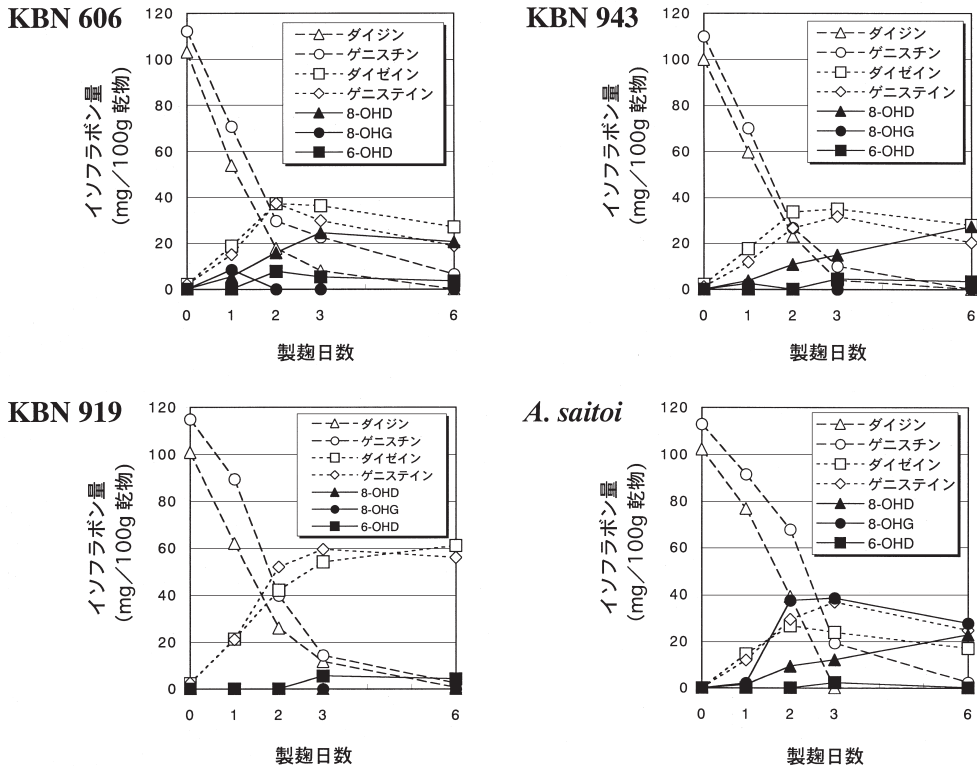


図3 各種大豆麹におけるイソフラボン類の変動

ダイゼインの8位の水酸化反応によって生成する8-OHDは、製麹日数3日目までほぼ直線的に増加し、3日目の含有量は24.5mg/乾物100gとなった。すなわち、配糖体より生成したダイゼインが、順次8-OHDに効率良く変換されたと考えられる。また、ダイゼインの6位の水酸化物である6-OHDは、2日目に7.8mgの含有量を示した。他方、ゲニステインの8位の水酸化物である8-OHGは、製麹1日目に生成し(8.5mg/乾物100g)、その後消失した。KBN 943株におけるODIの変動も、ほぼKBN 606株に類似していたが、8-OHDは3日後も増加を続け、6日目には27.4mg/乾物100gの含有量を示した。図中には示さなかったが、KBN 930, KBN 950, KBN 1010株のODIの変動もこの菌株のパターンに似ていた。また、KBN 969株では、これらODIの生成量は極めて少なかった。

*A. saitoi*においては、8-OHDはKBN 943株と同様に増加した。特に、ODIの中で最も強い抗酸化力を有する8-OHGの生成量が顕著に多く、3日目の麹で38.5mg/乾物100gという高含量を示した。他方、KBN 919株では、8-OHDや8-OHGの生成はいずれの製麹日数においても認められなかった。6-OHDの生成のみが、3日目および6日目に観察された。

以上、8-OHD、6-OHD、8-OHGの生成と変動は、麹菌の菌株の違いによってかなり異なる結果を得た。また、その生成量にも差異が認められた。これらの事実、この8-OHD、6-OHD、8-OHGの生成に関与する水酸化酵素はそれぞれ異なり、また各菌株によってその酵素が誘導される時期、或いはその活性も異なることを示唆している。今後、各麹

菌の産生する水酸化酵素を分離・精製し、その酵素学的諸性質を明らかにするとともに、各麹菌における酵素活性の発現機序についても検討する必要がある。

3.4 各種麹菌を用いた 6 日麹の抗酸化性と ODI 含量との相関

既報¹⁴⁾において、リボソームを用いた試験法で、ODI がダイゼインやゲニステインより有意に強い抗酸化性を示すことを明らかにした。ダイゼインおよびゲニステインの抗酸化活性(100-酸化率)は、試料濃度 10 μ M においてそれぞれ 4.8 および 15.6 と微弱であった。他方、8-OHD および 8-OHG の活性は、それぞれ 89.3 および 92.2 となり、顕著に強い抗酸化性を示した。また、6-OHD の抗酸化性も強く、8-OHD の活性とほぼ同程度であった⁶⁾。

KBN 919 株の 6 日麹の酸化率は 81% であり (図 1)、その抗酸化活性は 19 となる。この麹においては、6-OHD は微量含有されるが、8-OHD や 8-OHG が全く存在しないため (図 3)、その抗酸化性が弱くなったと推察される。他方、*A. saitoi* の 6 日麹では、ODI 含有量は多く (ODI 総和量: 50.9mg/乾物 100g)、強い抗酸化性 (抗酸化活性: 74) が認められた。8 種類の麹菌を用いた 6 日麹の抗酸化活性と、これら麹中の ODI 総和量との相関を調べたところ (図 4)、両者の間には危険率 1% 以下で、相関係数 $r=0.91$ という正の高い相関が確認された。すなわち、これら大豆麹のもつ抗酸化性の発現には、ODI が大きく寄与していると考察される。

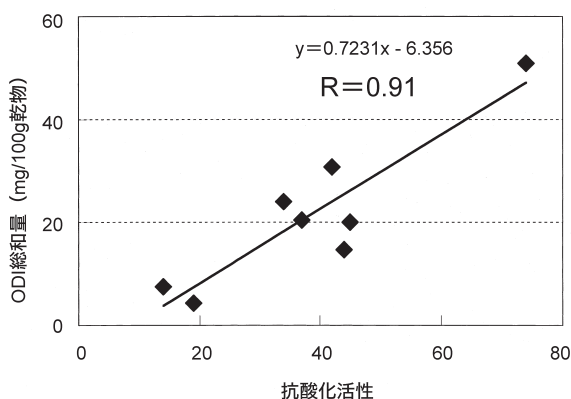


図4 各種大豆麹の抗酸化性と *o*-ジヒドロキシイソフラボン含量との相関

3.5 味噌玉麹各部位中の 8-OHD と 8-OHG 量の変動

これまでの実験結果は、大豆麹の製麹をバラ麹の状態で行ったものである。図 3 から明らかなように、*A. oryzae* 麹菌を用いたこのバラ麹培養では、多くの菌株において 8-OHD は製麹日数の経過とともに増加した。しかし、8-OHG の生成量は極めて少なかった。既報³⁾において、醸造メーカーより入手した豆味噌用の味噌玉麹や溜り醤油用の玉麹中には、かなりの量の 8-OHG が存在することを報告した。本実験では、KBN 943 株を用いて製麹を行った味噌玉麹 (0 日麹, 2 日麹, 4 日麹) を入手し、その表層部, 中層部, 深層部中の 8-OHD および 8-OHG 量を測定した (図 5)。この味噌玉麹の表層部における 8-OHD の生成と変動は、図 3 の KBN 943 株のバラ麹とほぼ一致していた。また中層部に

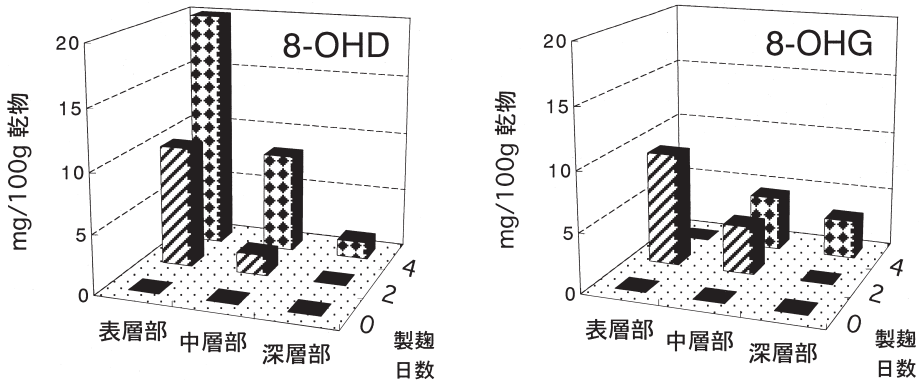


図5 味噌玉麹各部位における 8-OHD および 8-OHG の変動

においても、8-OHD は表層部と同様、製麹日数の経過とともに増加したが、その程度は緩やかであった。深層部においては、8-OHD の生成は遅く、4 日麹において微量が検出された。

他方、8-OHG の生成と変動は複雑であった。表層部では、2 日麹において 9.4mg / 乾物 100g の 8-OHG の生成が認められたが、その後消失した。中層部では、2 日麹における生成量は表層部に比べて少なかった (4.0mg / 乾物 100g) が、4 日麹においてもその多くは残存し、ほぼ同量の 8-OHG が検出された。深層部の 8-OHG の生成は、8-OHD と同様に 4 日麹において初めて認められた。

以上の実験結果より、*A. oryzae* 麹菌による 8-OHG の生成には、その製麹を味噌玉麹の状態で行うと有利であると考察される。8-OHG は強い抗酸化性を示すことから、反面、酸素ダメージによる酸化分解も大きいと推察される。また、8-OHG は酸性の pH 領域では比較的安定である。先にも述べたように、味噌玉麹の製麹時にはその内部 (中層部や深層部) で乳酸菌発酵も並行して進み、生成した乳酸等による pH の低下が進行する。その結果、8-OHG の分解が抑制される可能性は大きい。2 日麹の中層部の 8-OHG が 4 日麹にも多く残存した理由は、この pH の低下にあると推測される。他方、4 日麹の表層部における 8-OHG の消失は、麹表層部の高い pH と酸化分解が大きく関与したと考察される。

4. まとめ

麹菌は日本の伝統的発酵食品の製造に欠くことのできない微生物である。この麹菌は種々の酵素を豊富に産生し、原料中の各種成分を分解したり、微生物変換することにより、その食品のもつ一次機能、二次機能、また三次機能を高める可能性を有する。他方、これらの発酵食品がヒトの食生活のなかで長年利用されてきたことを考慮すると、安全性の高い微生物でもあると言える。

本研究では、特に「この麹菌のもつ大豆イソフラボン類の水酸化能」に着目して実験を進めた。まず、各種麹菌による大豆麹 (バラ麹) を調製した。これら麹中のイソフラボン類を分析したところ、原料大豆中のイソフラボン配糖体 (ダイジンおよびゲニスチン) は、いずれの麹菌を使用しても製麹日数の経過とともにほぼ同様にアグリコン化が進行し、ダ

イゼインおよびゲニステインを生成した。しかし、これらイソフラボン類の水酸化反応においては、麹菌の種類や菌株の違いによってその活性（水酸化能）に差異が認められた。そして、大豆麹中に強い抗酸化性を示す 8-OHD および 8-OHG を高含量に蓄積するには、*A. saitoi* 黒麹菌による製麹が極めて効果的であるという結論を得た。また、*A. oryzae* 麹菌の多くは 8-OHD の生成には有効であるが、このバラ麹培養における 8-OHG の生成・蓄積には難しさがあった。しかし、同じ麹菌を使用した味噌玉麹中には、かなりの量の 8-OHG の生成を認めることができた。今後、8-OHD や 8-OHG 生成能の高い *A. saitoi* 菌や *A. oryzae* 菌を用いて、大豆麹中の ODI 含量を高めるための培養条件等を検討する必要がある。

他方、本実験では、「各種麹菌で培養した大豆麹のもつ抗酸化能」についても検討した。最も強い抗酸化力を発現した大豆麹は、8-OHD および 8-OHG を高含量に含む *A. saitoi* 菌を使用したものであった。逆に、これら ODI 含量の少ない麹の抗酸化力は弱かった。ODI 含量と抗酸化活性との間には、正の高い相関 ($r=0.91$) が認められた。

以上、本研究において、各種麹菌を使用した大豆麹の抗酸化性および ODI の生成と変動について幾つかの知見を得ることができた。今後もこれらの研究をさらに進めるとともに、この大豆麹の新しい機能性食品素材としての利用についても検討して行きたい。

本研究は、主に、平成 11 年度および 12 年度の卒業研究において行われたものである。平成 11 年度卒業生の伊藤優子さん、平成 12 年度卒業生の畔柳幸さんに感謝の意を表します。

また、本研究は平成 10 ～ 11 年度科学研究費 [基盤研究(C)(2)研究課題番号 10680152] の助成を受けて行われたものの一部であることを付記する。

注

- 1) 五明紀春：食品と開発, **34**, NO. 7, 12 (1999).
- 2) 井上正康：化学と生物, **30**, 184 (1992).
- 3) 江崎秀男・川岸舜朗・井上昂・大澤俊彦：食科工, **48**, 51 (2001).
- 4) 江崎秀男・渡部綾子・増田均・大澤俊彦・川岸舜朗：食科工, **48**, 189 (2001).
- 5) 江崎秀男・大澤俊彦・川岸舜朗：食科工, **49**, 476 (2002).
- 6) Esaki, H., Kawakishi, S., Morimitsu, Y. and Osawa, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1637 (1999).
- 7) Esaki, H., Watanabe, R., Onozaki, H., Kawakishi, S. and Osawa, T.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 851 (1999).
- 8) 寺尾純二：活性酸素と医食同源, 井上正康編 (共立, 東京), p. 150 (1996).
- 9) 家森幸男・太田静行・渡邊昌編：大豆イソフラボン, (幸書房, 東京), p. 39 (2001).
- 10) 白崎友美・江崎秀男・武藤ゆうみ・大矢友子・川岸舜朗：平成 14 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 253 (2002).
- 11) Tsuda, T., Osawa, T., Nakayama, T., Kawakishi, S. and Ohshima, K.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 909 (1993).
- 12) Klus, K. and Barz, W.: *Arch. Microbiol.*, **164**, 428 (1995).
- 13) Klus, K. and Barz, W.: *Phytochemistry*, **47**, 1045 (1998).
- 14) Esaki, H., Onozaki, H., Morimitsu, Y., Kawakishi, S. and Osawa, T.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 740 (1998).